



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZA ADAMI MONTEIRO DE CASTRO

**ESTERILIZAÇÃO DE “MEL DE CACAU” (*Theobroma cacao* L.) POR
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

VITÓRIA, ES

2020

LUIZA ADAMI MONTEIRO DE CASTRO

**ESTERILIZAÇÃO DE “MEL DE CACAU” (*Theobroma cacao* L.) POR
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patricia Machado Bueno Fernandes

VITÓRIA, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C355e Castro, Luiza Adami Monteiro de, 1996-
Esterilização de “mel de cacau” (Theobroma cacao L.) por alta pressão hidrostática / Luiza Adami Monteiro de Castro. - 2020. 44 f. : il.

Orientadora: Patricia Machado Bueno Fernandes.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Biotecnologia. 2. Alimentos - Biotecnologia. 3. Alimentos - Microbiologia. 4. Pressão hidrostática. 5. Cacau. 6. Theobroma. I. Fernandes, Patricia Machado Bueno. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

LUIZA ADAMI MONTEIRO DE CASTRO

**ESTERILIZAÇÃO DE “MEL DE CACAU” (*Theobroma cacao* L.) POR
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 07 de fevereiro de 2020.

**Prof.^a Dr.^a Patricia Machado Bueno
Fernandes**
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

**Prof. Dr. Alexandre Martins Costa
Santos**
Universidade Federal do Espírito Santo

**Prof. Dr.^a Maria Emília Rodrigues
Valente**
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr.^a Mónica Montero-Lomelí
Universidade Federal do Rio de Janeiro

VITÓRIA, ES

2020

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por ter proporcionado minha formação acadêmica.

Aos órgãos de financiamento CAPES, FAPES e CNPq por investirem não só em mim como aluna, mas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA), no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e tantos outros, a fim de fomentar a ciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e todos os responsáveis pelo funcionamento e excelência.

A Prof.^a Dr.^a Patricia Machado Bueno Fernandes por ter me orientado e por ter promovido meu crescimento tanto acadêmico e profissional, quanto pessoal.

Aos membros da banca Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos, Prof. Dr.^a Maria Emília Rodrigues Valente e Prof. Dr.^a Mônica Montero-Lomelí por terem aceitado fazer parte desse momento e por toda contribuição.

Aos companheiros do LBAA da UFES por toda contribuição, ensinamentos, companheirismo e momentos descontraídos.

À minha família e amigos por todo amor, paciência e apoio nessa fase da minha vida, vocês foram e são fundamentais para mim.

À Raíssa Debacker Moura que sempre me acompanhou em todos esses anos do laboratório e que foi de enorme contribuição intelectual e emocional. Sou muito grata a ti por tanto.

Aos produtores de cacau José Manoel Monteiro de Castro e Emir de Macedo Gomes por terem auxiliado nesse projeto fornecendo o “mel de cacau” para os experimentos, em especial ao José por, além de ter ajudado no projeto, também ser o meu pai e o principal sonhador para o sucesso desse trabalho.

E por último, mas não menos importante, parafraseando a cantora contemporânea brasileira Anitta, eu sou muito grata a todos que de alguma forma me auxiliaram a chegar até aqui, mas eu também queria muito agradecer a mim mesma porque eu não desisti!

RESUMO

CASTRO, L. A. M. Esterilização de “mel de cacau” (*Theobroma cacao* L.) por alta pressão hidrostática. 2020. 44f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma planta nativa da América do Sul que começou a ser explorada pelos europeus após o descobrimento da América no século XVI. No entanto, foi só a partir de 1876 que o chocolate como conhecemos hoje começou a ser comercializado e consolidado no mercado, aumentando desde então o seu consumo e consequentemente a produção de cacau. A fim de promover o desenvolvimento sustentável das regiões produtoras de cacau do Brasil foram implantados centros de pesquisa e projetos voltado para esta planta, tendo com uma das linhas o aproveitamento do cacauzeiro em sua totalidade com o uso dos produtos, subprodutos e resíduos provenientes das plantações agregando valor à atividade agrícola. A partir daí o “mel de cacau”, o líquido transparente que escorre da polpa, passou a ser utilizado para produção de diferentes produtos como: sorvete, geleia, licor, vinho, vinagre e destilados. Esse produto tem ganhado mercado devido ao seu paladar agradável doce-ácido. No entanto, há uma necessidade de estabelecer tratamentos para aumento de vida de prateleira sem a adição de conservantes químicos, que podem levar a rejeição do mercado, além de influenciar o aroma do produto. A alta pressão hidrostática (HHP) é amplamente utilizada como uma ferramenta para esterilização de alimentos e oferece a vantagem de não alterar sensorialmente o produto. Porém, não existem trabalhos que tenham utilizado esta técnica para este derivado do cacau. Sendo assim, dois tratamentos distintos de HHP foram utilizados a fim de se testar um método eficiente para redução microbiana do “mel de cacau” e manter uma melhor estabilidade após 10 dias de armazenamento. Bem como foi realizado contagem dos microrganismos como: coliformes totais e fecais realizando teste presuntivo com LST e teste confirmativo com CVB e caldo EC; bactérias totais utilizando PCA; e fungos totais utilizando BDA. O tratamento de 50 MPa por 10 minutos, seguido da despressurização por 5 minutos e logo após 300 MPa por 50 minutos se mostrou mais eficiente na redução do número de microrganismos. Assim, a HHP apresenta potencial ação esterilizante do produto, sendo que mais estudos devem ser desenvolvidos para analisar a estabilidade da qualidade sensorial.

Palavras-chave: Tempo de prateleira. Tratamento não térmico. Processamento de alimentos. Segurança alimentar.

STERILIZATION OF “COCOA HONEY” (*Theobroma cacao* L.) BY HIGH HYDROSTATIC PRESSURE

ABSTRACT

CASTRO, L. A. M. Sterilization of “cocoa honey” (*Theobroma cacao* L.) by high hydrostatic pressure. 2020. 44f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduate Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a plant native to South America that began to be explored by Europeans after the discovery of America in the 16th century. However, it was only from 1876 that chocolate, as we know it today, started to be commercialized and consolidated in the market, increasing since then its consumption and consequently the production of cocoa. To promote the sustainable development of the cocoa-producing regions of Brazil, research centers and projects aimed at this plant have been implemented, with one of the lines taking full advantage of the cocoa tree with the use of products, by-products, and residues from the plantations adding value to agricultural activity. From then on, “cocoa honey”, the transparent liquid that drips from the pulp, started to be used for the production of different products such as ice cream, jelly, liquor, wine, vinegar, and distillates. This product has gained market share due to its pleasant sweet-acid taste. However, there is a need to establish treatments to increase shelf life without the addition of chemical preservatives, which can lead to market rejection, in addition to influencing the product's aroma. High hydrostatic pressure (HHP) is widely used as a tool for food sterilization and offers the advantage of not altering the sensorial properties of the product. However, there are no studies that have used this technique for this cocoa derivative. Therefore, two different HHP treatments were used to test an efficient method for microbial reduction of “cocoa honey” and to maintain better stability after 10 days of storage. Also, microorganisms were counted, such as total and fecal coliforms, performing a presumptive test with LST and a confirmatory test with CVB and EC broth; total bacteria using PCA; total fungi using BDA. The treatment of 50 MPa for 10 minutes, followed by depressurization for 5 minutes and immediately after 300 MPa for 50 minutes was more efficient in reducing the number of microorganisms. Thus, HHP has a potential sterilizing action of the product, and further studies should be developed to analyze the stability of sensory quality.

Keywords: Shelf Life. Non-heat treatment. Food processing. Food safety.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cacaueiro com frutos maduros..... 11
- Figura 2.** Porcentagem de produção de amêndoa de cacau por continente no ano de 2017. Tradução própria a partir dos dados obtidos de FAOSTAT (2019). 13
- Figura 3.** Os 10 maiores produtores de amêndoa de cacau no ano de 2017. 13
- Figura 4.** Esquema de um fruto de cacau. Adaptada de VectorStock, 2020. 14
- Figura 5.** Cacau maduro aberto mostrando a polpa aderida às sementes. 15
- Figura 6.** Amostras em embalagem estéril e selada..... 25
- Figura 7.** Desenho experimental..... 26
- Figura 8.** Sistema de pressão hidrostática. A - Prensa hidráulica manual equipada com manômetro. B - Cápsula de teflon em branco onde a amostra é acondicionada e posteriormente inserida em outra cápsula de material resistente à pressão localizada ao fundo da imagem..... 27
- Figura 9.** Resultado negativo da amostra não tratada com HHP para o teste presuntivo de coliformes. A – Série de 3 tubos inoculados com 1mL de amostra 1:10. B – Série de 3 tubos inoculados com 1mL de amostra 1:100. C – Série de 3 tubos inoculados com 1mL de amostra 1:1000..... 32
- Figura 10.** Resultado das contagens de bactérias aeróbias totais em meio PCA dos Tratamento 1 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 50min) e Tratamento 2 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 150 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 225 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 10min) com análises realizadas logo após a pressão e após 10 dias da pressão armazenado à 4°C. 33
- Figura 11.** Resultado das contagens de bolores e leveduras em meio BDA dos Tratamento 1 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 50min) e Tratamento 2 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 150 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 225 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 10min) com análises realizadas logo após a pressão e após 10 dias da pressão armazenado à 4°C. 34
- Figura 12.** Comparativo dos resultados das contagens de bactérias aeróbias totais em meio de cultura PCA e bolores e leveduras em meio de cultura BDA dos Tratamento 1 (50MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 50min) e Tratamento 2 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 150 MPa por 10min → 0,1

MPa por 5min → 225 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 10min) com análises realizadas logo após a pressão.35

Figura 13. Comparativo dos resultados das contagens de bactérias aeróbias totais em meio de cultura PCA e bolores e leveduras em meio de cultura BDA dos Tratamento 1 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 50min) e Tratamento 2 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 150 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 225 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 10min) com análises realizadas após 10 dias da pressão armazenado à 4°C.36

Figura 14. Placa ilustrando bolores e leveduras presentes no “mel de cacau” submetido ao tratamento 1 e analisadas após 10 dias de armazenado à 4°C, na diluição 1:100 em meio BDA.37

Figura 15. Imagens da levedura de colônia rosada extraída da placa de amostra de “mel de cacau” submetido ao tratamento 1 e analisadas após 10 dias armazenado à 4°C, na diluição 1:100 em meio BDA. As células foram coradas com Calcofluor White Stain (Sigma) e as imagens capturadas usando o microscópio Nikon Eclipse Ti-U na objetiva de 100x.38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDA - Batata Dextrose Ágar
CVB - Caldo Vede Brilhante Bile 2%
HHP - Alta Pressão Hidrostática (do inglês *High Hydrostatic Pressure*)
LST - Caldo Lauril Sulfato
MPa – Mega Pascal
NMP/mL - Número Mais Provável por Mililitro
PCA - Ágar Padrão para Contagem (do inglês *Plate Count Agar*)
PEF - Campo Elétrico Pulsado (do inglês *Pulsed Electric Field*)
UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônias por Mililitro
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 A CACAUCULTURA	11
1.1.1 Importância econômica e aplicações do cacauero	13
1.1.2 O “mel de cacau”	15
1.2 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO	16
1.2.1 Alta Pressão Hidrostática	19
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 AMOSTRAS	24
4.2 TRATAMENTOS COM ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA	25
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	30
5.1.1 Análises para coliformes e <i>Salmonella sp.</i>	31
5.1.2 Análises para bactérias mesófilas aeróbias após tratamentos com HHP	32
5.1.3 Análises para fungos logo após tratamento com HHP	34
6 CONCLUSÃO	39
7 PERSPECTIVAS	40
REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE A – Quadros Com as Médias das Contagens de Bactérias Totais e de Fungos Totais	43
ANEXO A – Tabela do Número Mais Provável	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 A CACAUCULTURA

O cacau (*Theobroma cacao* L.) conhecido mundialmente por ser a matéria prima do chocolate e sua planta pertence à classe Magnoliopsida, ordem Malvales, família Malvaceae e gênero *Theobroma*, sendo a principal cultura cultivada do gênero (Figura 1). Além disso, o cacaeiro é caracterizado como uma árvore perene que quando em vegetação densa pode apresentar até 20 m, e em cultivo comercial ou em floresta raleada (sistema cabruca) pode atingir de 6 a 9 m. Adicionalmente, esta planta apresenta melhor desenvolvimento à sombra, sendo nativa de floresta tropical quente e úmida, e quando em condições ideais de cultivo pode viver mais de cem anos. Seu processo de frutificação se inicia em torno de 3 anos, possuindo uma produção satisfatória entre os 8 e 30 anos (DE SOUZA et al., 2018; MORORÓ, 2012).



Figura 1. Cacaeiro com frutos maduros.

O centro de diversidade desta espécie está localizado nas nascentes e bacias dos rios Amazonas e Orenoco. Dentre as variedades encontradas, a variedade Criollo é naturalmente dispersa ao norte do rio Orinoco, alcançando a América Central, já a

variedade Forasteiro é conhecida como o verdadeiro cacau brasileiro, devido sua distribuição pela base da Amazônia a partir das Guianas ao Brasil. Além disso, uma terceira variedade conhecida como Trinitário, consiste no cruzamento das duas variedades anteriores (DE SOUZA et al., 2018; MORORÓ, 2012).

O desenvolvimento, processamento e aplicação da cultura cacauera vem crescendo ao longo dos anos. Antes da colonização europeia da América no século XV, os índios Maias e Astecas utilizavam a semente seca do cacau como moeda e na formação de uma massa firme que facilitava seu transporte. As sementes eram torradas, descascadas, moídas e batidas até a formação de uma pasta grossa que ao incorporar farinha de milho, açúcar, especiarias, pimenta e água quente, se tornava uma bebida espessa muito apreciada e de importância mística para essas civilizações, conhecida como chocolate. De acordo com historiadores, o cacauero era considerado sagrado e foi esse significado religioso que inspirou a designação *Theobroma fructus* (*Theo* = Deus, *broma* = alimento – Alimento dos Deuses) em 1737 por Carlos Linneaus, e posteriormente modificado para *Theobroma cacao* L. em 1753 (CEPLAC, 2019; MORORÓ, 2012).

Após o descobrimento da América, ao final do século XVI as sementes de cacau foram levadas para a Europa, tendo seu processamento alterado com a adição de leite quente em substituição à farinha de milho, pimenta e água. A partir do século XVI o cultivo do cacau começou a se difundir para outros países de clima tropical, causando grande impacto na cultura. Em 1828, Coenraad Van Houten inventou uma prensa hidráulica para a separação da gordura (manteiga de cacau) da amêndoa do cacau. Adicionalmente, após a invenção do leite em pó por Henri Nestlé e a introdução do mesmo na produção de chocolate por Daniel Peter de Vevey, em 1876 foi produzido, o primeiro chocolate ao leite. Já o chocolate em barra se deve aos suíços Rudolphe Lindt e Jean Tobler que inventaram, respectivamente, os processos de conchagem e temperagem, permitindo assim, a produção de uma pasta lisa e sedosa que endurece em temperatura ambiente ficando mais suave e agradável ao paladar. A partir de então, deu-se início a uma paixão que seria difundida e conquistaria o mundo (BECKETT, 2009; MINIFIE, 2005; MORORÓ, 2012).

1.1.1 Importância econômica e aplicações do cacau

Apesar de ter sua origem nas Américas, os maiores produtores de cacau são países da África Ocidental, sendo eles responsáveis por cerca de 70% da produção mundial (Figura 2).

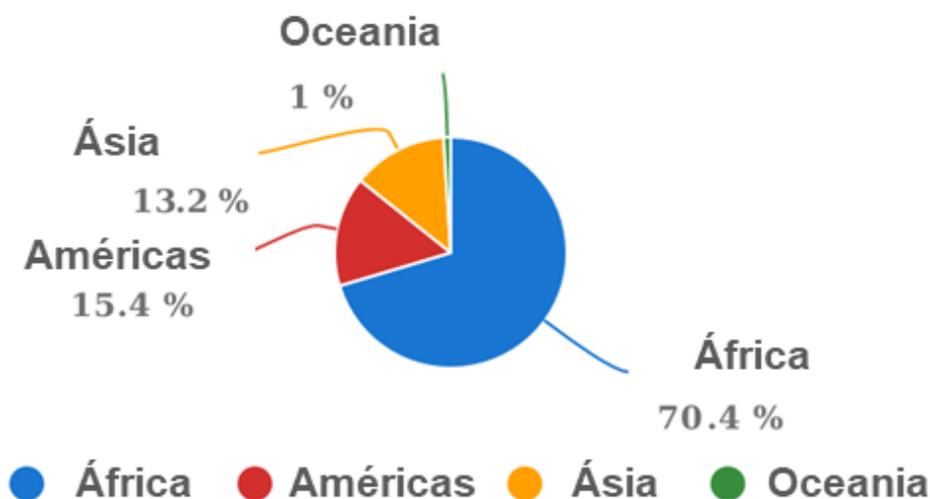


Figura 2. Porcentagem de produção de amêndoa de cacau por continente no ano de 2017. Tradução própria a partir dos dados obtidos de FAOSTAT (2019).

O Brasil já esteve na segunda posição de maior produtor mundial de cacau; porém, em 1989, com a dispersão da vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, o país viu sua produção cair drasticamente, passando de exportador para importador deste produto, e atualmente se encontra na sexta posição, como indicado na Figura 3 (DE SOUZA et al., 2018; FAOSTAT, 2019).

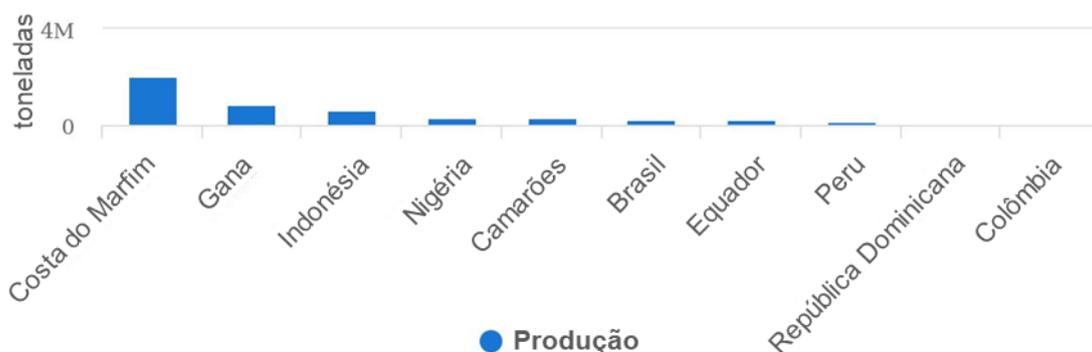


Figura 3. Os 10 maiores produtores de amêndoa de cacau no ano de 2017. Tradução própria a partir dos dados obtidos de FAOSTAT (2019).

Com o aumento do cultivo e produção do cacau no decorrer dos anos, houve o aumento da produção de seus resíduos que, frequentemente, eram mal aproveitados. Além disso, o manejo não adequado durante processos de plantios, colheita e pós-colheita pode atuar na disseminação de doenças para a própria planta. Assim, a fim de promover o desenvolvimento sustentável com o aproveitamento em sua totalidade do fruto do cacau, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de contribuir com o uso não só das amêndoas secas, mas também de subprodutos como a casca, a polpa, o “mel de cacau” e outros.

A casca e a testa do fruto podem ser aproveitadas para fabricação de ração animal, produção de biogás e biofertilizantes e para compostagem; a polpa e o “mel” extraído podem ser utilizados na produção de suco, néctar, licor, vinagre, bebidas fermentadas, geleia, etc.; a placenta ou cibirra é utilizada para produção de doce cristalizado; além das amêndoas fermentadas, secas, torradas e descascadas que são utilizadas na produção da massa de cacau, chocolate, manteiga, etc. A fim de ilustrar, a Figura 4 apresenta um esquema de um fruto de cacau (MORORÓ, 2012).

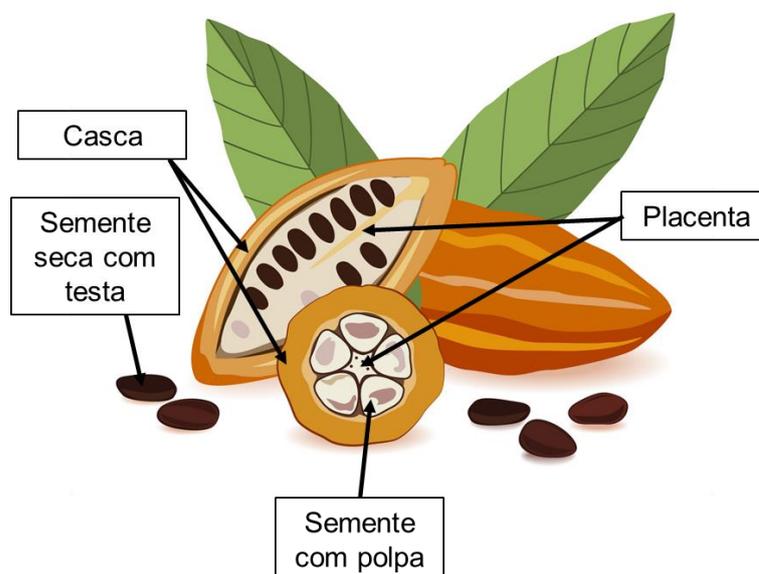


Figura 4. Esquema de um fruto de cacau. Adaptada de VectorStock, 2020.

1.1.2 O “mel de cacau”

Cerca de 80% do fruto de *T. cacao* corresponde a casca e 20% à polpa e semente (Figura 5). As sementes são cobertas por polpa mucilaginosa branca rica em açúcares e em pectina com sabor ácido-doce que pode ser ou não parcialmente separada antes do processo de fermentação das amêndoas. Da polpa escorre um líquido transparente que possui a denominação regional de “mel de cacau” que é composto basicamente de água (74,94%), açúcares fermentáveis (10-19%), ácidos não voláteis (0,77-1,52% em ácido cítrico), pectina (0,9-2,5%) e baixo percentual de fibras (0,7%). Assim, este subproduto do cacau apresenta uma alta viscosidade que permite a produção de néctares, licores, geleias, vinagres, dentre outros (MORORÓ, 2012; SANTOS, 2012).



Figura 5. Cacau maduro aberto mostrando a polpa aderida às sementes.

Alguns processos podem ser feitos a fim de se obter o “mel de cacau”. Em meio a plantação, pode ser observado a separação do líquido das sementes ao colocar as mesmas sobre uma folha de bananeira e em uma inclinação que permitia o direcionamento para um recipiente. Bem como a deposição das sementes em uma malha de nylon, sendo as mesmas levemente pressionadas e mantidas suspensas para que o líquido viscoso escorra, por gravidade, para um recipiente higienizado. No entanto, quando o produtor possui interesse em comercializar o “mel”, após a limpeza

e abertura dos frutos, as sementes são acondicionadas em uma prensa própria ou passam por uma centrifugação para separação do líquido presente na polpa, gerando possivelmente um maior controle de possíveis contaminantes microbiológicos (DE SOUZA et al., 2018; MORORÓ, 2012; SANTOS, 2012).

Ainda que a produção seja em média de 200 L para cada 750 kg de amêndoa seca por hectare (CEPLAC, 2019), o “mel de cacau” apresenta potencial para comercialização devido a cultura cacaeira já estar estabelecida em algumas regiões, podendo atuar como um produto adicional considerando à grande aceitação do consumidor. No entanto, devido a sua espontânea e rápida fermentação, o produto acaba não sendo estável microbiologicamente e curta vida de prateleira inviabiliza a sua comercialização para consumo humano. Sendo assim, a aplicação de tecnologias eficientes que permitam o processamento do produto sem a perda de propriedades sensoriais e o aumento da vida de prateleira, é extremamente importante para a comercialização e estabelecimento do produto no mercado.

1.2 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO

As técnicas de conservação de alimento vieram como solução para aumentar sua vida útil. Para as sociedades de caçadores/coletores em 2000 a.C. provavelmente a principal preocupação era obter alimentos e consumi-los rapidamente para que os mesmos não deteriorassem. O início das técnicas de conservação de alimentos surgiu em 500 a.C., com o processo de adição de sal aos alimentos, e progrediu somente em meados do século 19, com o armazenamento de alimentos em gelo, uma das primeiras formas de refrigeração. Em 1864, o avanço científico da conservação de alimentos deu um salto significativo com o desenvolvimento da pasteurização e, quase 100 anos depois, o processo de irradiação prolongou a vida útil dos alimentos por mais tempo do que a pasteurização, permitindo que os alimentos permaneçam estáveis por mais tempo. No entanto, ao final do século 20, muitos consumidores passaram a considerar o alimento irradiado não saudável, levando o aumento da demanda por alimentos frescos naturais, minimamente processados, como leite cru e

sucos não pasteurizados, trazendo consigo desafio à segurança alimentar (BYRD-BREDBENNER et al., 2015).

A conservação de alimentos do ponto de vista microbiológico tornou-se uma grande preocupação para os consumidores, indústrias de alimentos e agências reguladoras em todo o mundo. Agentes biológicos são os mais significativos causadores das doenças relacionadas ao consumo de alimentos. Embora diversos métodos de conservação de alimentos já serem empregados, a contaminação e a deterioração microbiana são um problema que ainda necessita ser controlado de forma eficaz. Apesar do desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de conservação, elas podem afetar negativamente as propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos e, assim, reduzir a aceitabilidade do consumidor (KHAN et al., 2017).

Adicionalmente à problemática da deterioração microbiana, há uma tendência dos consumidores em diminuir a aceitação de alimentos com conservantes e outros aditivos químicos. Os principais objetivos do uso de aditivos alimentares são melhorar e manter o valor nutricional, melhorar a qualidade, reduzir o desperdício, aumentar a aceitabilidade do produto, tornar o alimento mais prontamente disponível e facilitar o processamento de itens alimentares. Conservantes são definidos como substâncias capazes de inibir, retardar ou interromper o crescimento de microrganismos ou qualquer outra deterioração resultante de sua presença. Porém, apesar de aditivos e conservantes químicos para alimentos serem considerados seguros, vários deles podem ter efeitos colaterais negativos principalmente em pessoas sensíveis ao composto (AMIT et al., 2017).

Assim, prevê-se um declínio no crescimento das indústrias globais de processamento de vegetais e alimentos uma vez que a mudança tecnológica está focada na melhoria da eficiência do processamento e a forte concorrência de alimentos substitutos, como frutas e vegetais frescos (AMIT et al., 2017). Um levantamento realizado por Román, Sánchez-Siles e Siegrist (2017), mostrou que para a maioria dos consumidores nos países desenvolvidos, a naturalidade dos alimentos é importante. Apesar do Brasil ser considerado um país em desenvolvimento, há uma tendência à busca por alimentos mais saudáveis. Para isso, é necessário o alimento estar livre de ingredientes artificiais para a percepção da naturalidade.

Pesquisadores e a indústria de alimentos têm se interessado em tecnologias não térmicas para preservar a qualidade nutricional dos alimentos, isso se deve aos tratamentos térmicos tradicionais (pasteurização e esterilização) apresentarem contagens microbianas a níveis seguros à custa da qualidade sensorial e nutricional de um produto, ou seja, formação de sabor indesejável, degradação oxidativa e perda de pigmentos e vitaminas. Assim, inúmeras tecnologias não térmicas foram desenvolvidas para sucos de frutas e vegetais, como: ultrassonicação; campo elétrico pulsado (PEF); irradiação; e processamento por alta pressão (ROOBAB et al., 2018).

A ultrassonicação consiste em ondas sonoras que produzem bolhas de pressão e gás promovendo a criação de cavitações na parede celular dos microrganismos, bem como a produção de radicais livres, e a extrusão da matriz intracelular levando a um efeito bactericida. Apesar da eficiência contra células vegetativas, quando se trata de esporos o tratamento com ultrassom não apresenta eficácia. A ultrassonicação pode ter limitações em escala comercial se for necessária alta energia para o processo, além de afetar a físico-química e, conseqüentemente, a qualidade dos alimentos (ROOBAB et al., 2018).

Campo elétrico pulsado tem recebido muita atenção, pois exerce um efeito semelhante ao do tratamento térmico, mas não altera os parâmetros físico-químicos e de qualidade sensorial do produto. O efeito do PEF na qualidade microbiológica foi estudado para a descontaminação de alimentos líquidos de baixa viscosidade, como suco de uva e suco de laranja. Esta técnica consiste na formação de poros na membrana dos microrganismos sob a influência de um campo elétrico ao redor da célula, efeito conhecido como eletroporação, devido a despolimerização de macromoléculas levando à sua inativação sem afetar as qualidades nutricionais e sensoriais do suco. É uma tecnologia eficaz na inativação de células bacterianas vegetativas e fungos, porém os esporos bacterianos são resistentes (KHAN et al., 2017; ROOBAB et al., 2018).

A tecnologia de processamento de irradiação de alimentos e a radiação gama são amplamente utilizadas como um método seguro e comprovado em todo o mundo para a preservação de produtos alimentícios. Estas técnicas utilizam radiação ionizante para eliminar patógenos e envolve o uso de isótopos radioativos ou elétrons

acelerados (pasteurização eletrônica/feixe de elétrons) (KHAN et al., 2017; ROOBAB et al., 2018).

A radiação UV na região de 200 a 280 nm do espectro eletromagnético tem um efeito letal nos microrganismos. Enquanto a irradiação UV afeta diretamente a molécula de DNA, provocando mutações que alteram a atividade desta molécula inibindo a reprodução dos microrganismos, a exposição à radiação γ induz o aumento de moléculas altamente reativas causando danos oxidativos às moléculas biológicas inibindo o crescimento microbiano. Apesar disso, há estudos que apontam a perda de vitaminas dos alimentos tratados por irradiação, além da produção de elementos oxidativos que podem diminuir a vida de prateleira dos produtos. Entretanto, o limite de irradiação permitido não elimina por completo os organismos presentes nos alimentos e, portanto, aqueles que sobrevivem podem representar uma ameaça para os consumidores. Para alcançar a esterilização, a dose deve ser aumentada, mas pode afetar outros atributos de qualidade do alimento (KHAN et al., 2017; ROOBAB et al., 2018).

1.2.1 Alta Pressão Hidrostática

A alta pressão hidrostática (HHP) é uma tecnologia de processamento não térmico que tem sido aplicada na indústria de alimentos desde 1990 como uma etapa pós-pasteurização para inativação microbiana. O tratamento por HHP utiliza a água como meio para transmitir pressão ao produto e pode efetivamente inativar a maioria dos organismos patogênicos e deteriorantes, incluindo fungos e bactérias. A HHP tem o potencial de servir como um importante método de preservação sem degradar vitaminas, compostos que conferem sabores e pigmentos durante o processo, mantendo o frescor e sabor aprimorado com alto valor nutricional. Esse processo também é favorável ao meio ambiente, uma vez que o consumo de energia é muito baixo e há mínima liberação de efluentes. A efetividade da inativação depende da pressão, do tempo de retenção e da temperatura aplicada, além de estar relacionada

à resistência do microrganismo e da matriz alimentar no processamento da HHP (AMIT et al., 2017; ROOBAB et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

O uso comercial da alta pressão hidrostática passou a ser uma realidade devido a comprovação de sua eficiência na descontaminação, aumento da estabilidade e para produção de um produto de alta qualidade. Sabe-se que diferentes microrganismos se comportam de maneira distinta sob a HHP e têm diferentes características de resistência à pressão. Além disso, a composição físico-química do produto influencia na determinação do melhor tratamento a ser aplicado. Suco de Arônia (*Aronia melanocarpa*), planta nativa da América do Norte, apresentou melhor estabilidade microbiana e de compostos fenólicos com melhor custo benefício quando tratado com HHP nas condições 400 MPa por 15 minutos em temperatura ambiente (BŁASZCZAK; AMAROWICZ; GÓRECKI, 2017). Já o suco de laranja foi tratado nas condições 600 MPa por 1 minuto e apresentou uma completa inativação microbiana, aumentando o tempo de prateleira para até 2 meses mantendo a característica de suco fresco quando armazenado em 4°C (TIMMERMANS et al., 2011). McKay et al., (2011) também mostrou uma completa inativação de microrganismos em suco de maçã tratado com pressões de 300 – 600 MPa por 1 minuto.

O principal mecanismo para o efeito de esterilização após o tratamento por HHP é a destruição irreversível da estrutura celular microbiana, resultando em modificação da permeabilidade e interrupção da funcionalidade das membranas celulares e paredes celulares. Acredita-se que o dano causado às ligações não covalentes sensíveis (ligações hidrogênio, iônicas e hidrofóbicas) presentes em grandes moléculas (proteínas, polissacarídeos, lipídios e ácidos nucléicos) seja o principal mecanismo pelo qual o HHP provoque a inativação de microrganismos e seus efeitos nas células. Além disso, a estrutura secundária, terciária ou quaternária de grandes moléculas e estruturas organizadas complexas são alteradas pelo tratamento com HHP. Esse processo envolve o desdobramento de proteínas ou enzimas, a alteração na fluidez da transição de fase da membrana celular, a alteração intracelular do pH e quebra dos ribossomos. Dessa forma, esses efeitos eventualmente causam desnaturação parcial ou completa dos componentes celulares (ROOBAB et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

Mesmo uma pressão de 50 MPa já é suficiente para inibir a síntese de proteínas e para alterações ribossômicas em um microrganismo. Aumentar a pressão para 100 e

200 MPa induzirá a desnaturação de proteínas e membranas celulares, além de afetar a matriz intracelular. A 300 MPa, espera-se uma ruptura da membrana celular, vazamento da matriz intracelular e eventual morte do microrganismo. Já 600 MPa não apenas inibe o crescimento da maioria dos microrganismos patogênicos, mas também pode inativar endósporos quando aplicada em combinação com a tratamento térmico. O uso da pressão de 800 MPa resulta em uma quase esterilização, com uma ligeira alteração nas propriedades sensoriais de sucos (ROOBAB et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

As características físico-químicas do “mel de cacau” associado ao clima tropical quente e úmido faz com que o mesmo apresente rápida fermentação, e conseqüentemente, o produto se torne impróprio para consumo. Ainda assim, há registro de comercialização do produto após tratamento por pasteurização a baixa temperatura e adição de conservante. Entretanto, tais tratamentos não correspondem positivamente à obtenção de um produto final fidedigno ao inicial em relação a características sensoriais e aceitação do consumidor (MERCADO DO CACAU, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando pesquisas relacionadas a eficiência da HHP, é evidente as possibilidades de aplicação desta técnica em outros sucos de fruta, como o “mel de cacau”, auxiliando diretamente no processamento deste produto e no seu tempo de prateleira. Entretanto, a falta de estudos acerca do controle microbiológico do “mel de cacau” em relação à HHP dificulta a utilização desta tecnologia e, possivelmente, a consolidação deste produto. Portanto, para a obtenção de um produto minimamente processado e sem aditivos ou estabilizantes químicos, com uma baixa ou ausência de alteração organoléptica, é importante a aplicação de ferramentas biotecnológicas, como HHP, que proporcione a redução da contagem microbiana do “mel de cacau” a fim de aumentar a vida de prateleira do mesmo. Isto também irá propiciar a comercialização de um produto de qualidade e valor agregado superior.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do processamento do “mel de cacau” por alta pressão hidrostática, visando a obtenção de um produto final adequado com as condições sanitárias determinadas pela Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar qual tratamento com alta pressão hidrostática é mais adequado para a conservação do “mel de cacau”;
- Avaliar qual o tratamento com alta pressão hidrostática é mais adequado visando a estabilidade microbiológica do produto por 10 dias;
- Identificar qual armazenamento, à 25°C ou 4°C, é ideal após tratamento com alta pressão hidrostática.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

O “mel de cacau” foi obtido após a colheita dos frutos realizada nos meses de janeiro, novembro e dezembro de 2019, nos municípios de Iconha – ES e Linhares – ES. Após limpeza, os mesmos foram abertos para que as sementes fossem depositadas em uma malha de nylon. Posteriormente, esta malha foi colocada acima de um recipiente para que ocorresse a coleta do líquido proveniente da polpa do fruto pela ação da gravidade. Para maior aproveitamento do material oferecido pela fruta foi feita adicionalmente uma compressão. Todo o sistema de coleta do “mel” foi previamente higienizado.

Uma vez que a coleta foi realizada, o “mel de cacau” foi acondicionado em garrafas de plástico higienizadas e congeladas em refrigerador residencial do produtor para transporte e futuras análises no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio localizado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), *Campus Maruípe*.

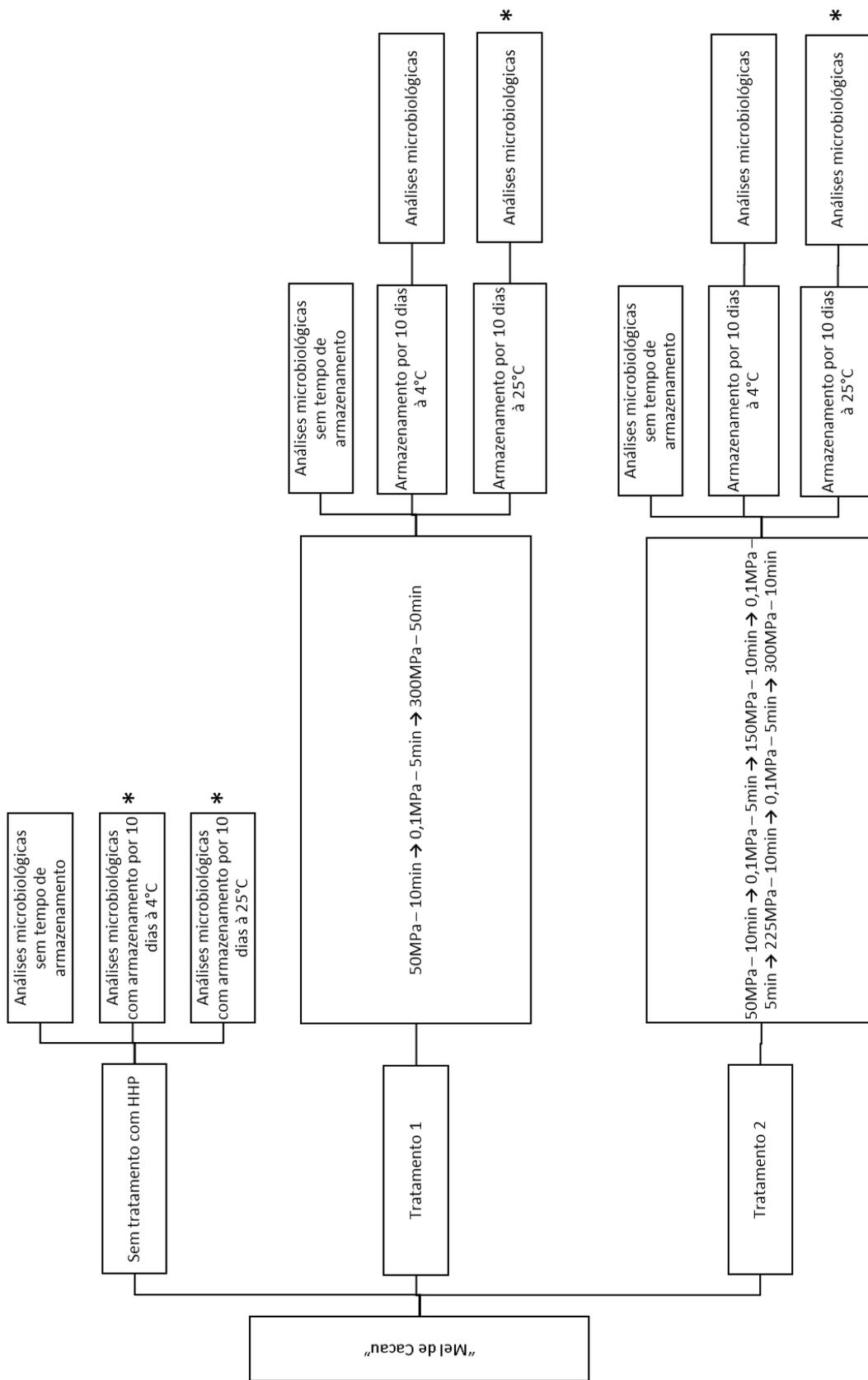
Para a realização dos experimentos, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, distribuídas em embalagens plásticas autoclavadas e seladas por aquecimento (Figura 6). As amostras foram organizadas em triplicata para os posteriores tratamentos com HHP e subsequentes análises.



Figura 6. Amostras em embalagem estéril e selada.

4.2 TRATAMENTOS COM ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Para a análise dos efeitos da HHP no processamento de “mel de cacau”, foram realizados dois tratamentos distintos a serem comparados quanto à eficiência na inibição do crescimento de microrganismos. O tratamento 1 corresponde à aplicação de uma baixa pressão hidrostática, 50 MPa por 10 minutos, seguida de um intervalo de 5 minutos à pressão ambiente (0,1 MPa) e finalizada com uma pressão maior de 300 MPa por 50 minutos. O tratamento 2 consiste em aplicar pressões sucessivamente mais altas que as anteriores e com intervalos em pressão ambiente, sendo 50 MPa, 150 MPa, 225 MPa e 300 MPa cada uma por 10 minutos e com intervalos entre pressões de 5 minutos à pressão ambiente (0,1 MPa) (Figura 7).



* - Análises que foram impossibilitadas de serem realizadas.
Figura 7. Desenho experimental.

Para aplicação de alta pressão hidrostática as amostras foram posicionadas dentro de um tubo de teflon de 15 - 25mL com 2,7cm de diâmetro previamente higienizadas com hipoclorito de sódio 1% (v/v) seguido de etanol 70% (v/v). Os espaços entre a embalagem e tubo foram preenchidos com água destilada estéril, as bolhas de ar foram removidas e então o tubo foi fechado hermeticamente para serem posicionadas no interior de uma cápsula de material resistente à pressão (Figura 8 – B).

A pressão foi obtida pela compressão da cápsula de teflon utilizando uma prensa hidráulica manual (Eureka, MG, Brasil) e mensurada com manômetro calibrado (Woler Brasileira, MG, Brasil) (Figura 8 – A). Durante todo o tratamento as amostras foram mantidas à temperatura do ambiente do laboratório (~23°C).

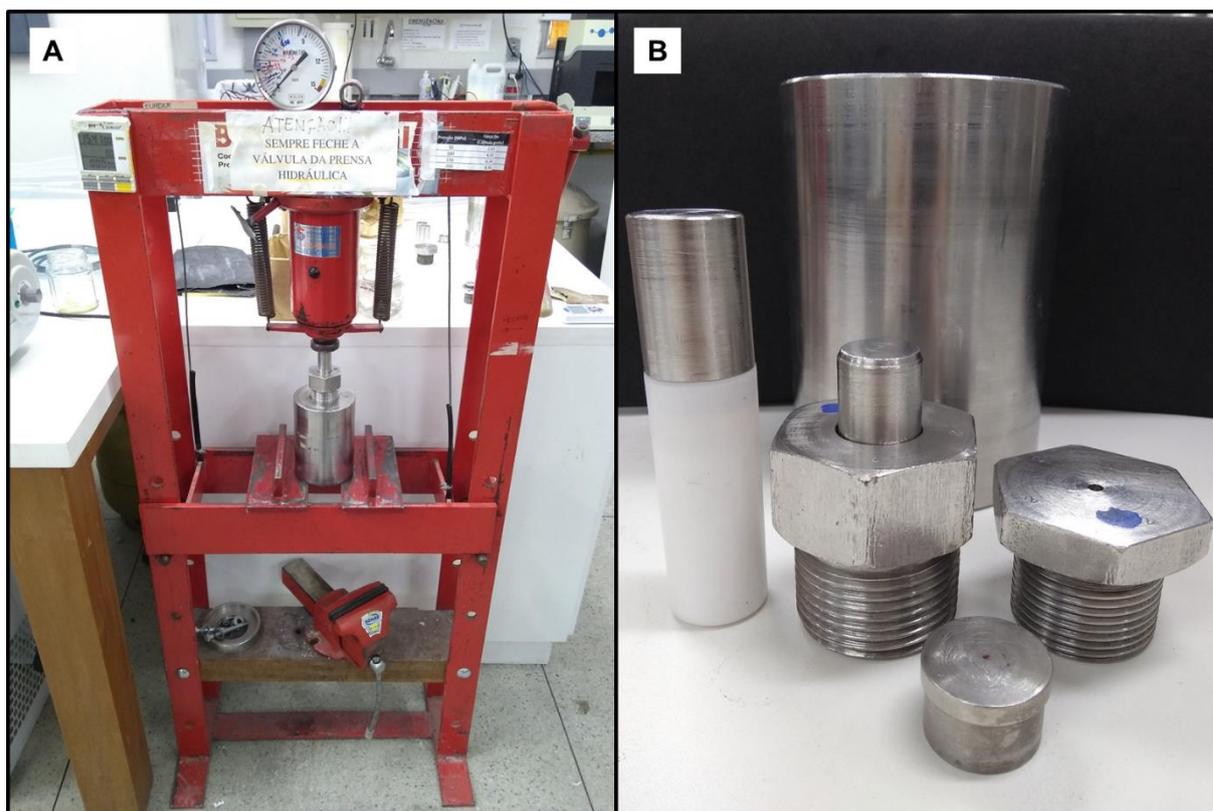


Figura 8. Sistema de pressão hidrostática. A - Prensa hidráulica manual equipada com manômetro. B - Cápsula de teflon em branco onde a amostra é acondicionada e posteriormente inserida em outra cápsula de material resistente à pressão localizada ao fundo da imagem.

4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas para quantificar as bactérias totais, fungos totais, *Salmonella sp.*, coliformes totais e coliformes termotolerantes foram realizadas em três repetições e seguindo os protocolos da FDA (2019) para cada tipo de microrganismo. Além das amostras não tratadas, as amostras dos tratamentos 1 e 2 foram analisados logo após HHP. Já para análise de estabilidade em prateleira, os dois tratamentos foram analisados 10 dias após HHP, sendo dividido em amostras armazenadas em temperatura ambiente (25°C) e na geladeira (4°C) (Figura 7).

Após os tratamentos, as amostras foram diluídas em série (1:10, 1:100 e 1:1000) em água peptonada 0,1% (m/v) estéril, para então serem inoculadas nos respectivos meios de cultura para análise.

As bactérias totais foram quantificadas utilizando o meio de cultura Ágar Padrão para Contagem (PCA) por meio da técnica de plaqueamento por profundidade adicionando-se 1mL de amostra, sendo incubadas por 48h à 35°C. Os fungos totais foram analisados utilizando o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acidificado com Ácido Tartárico 10 % (m/v) para aproximadamente pH 3,5. Também foi utilizado a técnica de plaqueamento por profundidade com 1mL de amostra e o período de incubação foi de 5 dias à 30°C.

Para a análise de *Salmonella sp.* foi utilizado o meio SS Ágar, sendo que 0,1mL de cada amostra foram aplicadas na superfície do meio e cultivadas por 48h à 35°C. Em cada repetição, as placas dos três meios de cultura foram preparadas em duplicata para cada diluição. Após os respectivos tempos de incubação das placas, as mesmas foram contadas e expressas em unidades formadoras de colônias por mililitro de amostra (UFC/mL).

Os coliformes foram analisados utilizando meios de cultura presuntivo e confirmativo inoculados com 1mL de amostra, sendo, o Caldo Lauril Sulfato (LST) para o teste presuntivo e os Caldo EC e Caldo Vede Brilhante Bile 2% (CVB) para os testes confirmativos. O meio LST foi incubado por 48h à 35°C e os os tubos positivos, que apresentaram produção de gás no tubo de Durham, tiveram uma alíquota transferida para os meios confirmativos para coliformes totais (meio CVB, incubado por 48h à

35°C) e coliformes termotolerantes (caldo EC, incubado por 48h à 45°C). Os tubos positivos foram comparados com a tabela estatística que indica o número mais provável do microrganismo pesquisado por mililitro de amostra (NMP/mL) (ANEXO A).

Foram utilizados os padrões microbiológicos sanitários para alimentos apresentados na Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA como parâmetro para “sucos e refrescos ‘*in natura*’, incluindo água de coco, caldo de cana, de açaí e similares isolados ou misturas” em que é considerando um limite de 10^2 /mL para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella sp.*. Além de “sucos pasteurizados e refrigerados, incluindo água de coco, caldo de cana, de açaí e similares, isolados ou em mistura” em que o limite de coliformes termotolerantes é de 10/mL e ausência de *Salmonella sp.*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A alta pressão hidrostática já é uma ferramenta eficientemente utilizada para tratamento de sucos de fruta. No entanto, cada produto possui um conjunto de características físico-químicas levando a necessidade de diferentes tratamentos para cada produto considerado. O “mel de cacau” é rico em açúcares o que, dentre outras propriedades, favorece a rápida multiplicação de microrganismos. A reduzida literatura sobre esse produto indica a necessidade de realização de diferentes testes e análises para identificação de quais tratamentos são mais eficientes na descontaminação, no aumento da vida de prateleira sem ou com mínima alteração principalmente na qualidade sensorial, e que possibilite a não utilização de conservantes ou estabilizantes. Assim, a HHP já vem sendo destacada na literatura como uma ferramenta eficiente para o controle microbiológico de alimentos e bebidas, mantendo a qualidade do sabor e dos nutrientes (WANG et al., 2016).

Foram realizadas análises microbiológicas para mesófilos aeróbios tanto bactérias totais quanto fungos totais, além de coliformes e *Salmonella sp.*. As médias das contagens desses grupos de microrganismos estão representadas no Apêndice A. De acordo com a ANVISA (2001), para “sucos e refrescos ‘*in natura*’, incluindo água de coco, caldo de cana, de açaí e similares isolados ou misturas” é considerando um limite de 10^2 /mL para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella sp.*. Já para “sucos pasteurizados e refrigerados, incluindo água de coco, caldo de cana, de açaí e similares, isolados ou em mistura” o limite de coliformes termotolerantes é de 10/mL e ausência de *Salmonella sp.*. A análise de mesófilos aeróbios foi complementar para este trabalho, visto a ausência de parâmetros indicados pela ANVISA, para identificar a diferença na contagem total de microrganismos, tanto fungos como bactérias, entre os tratamentos e a vida de prateleira.

5.1.1 Análises para coliformes e *Salmonella sp.*

A partir das análises da presença de coliformes totais e termotolerantes, como também de *Salmonella sp.* nas amostras não tratadas de “mel de cacau” foi possível constatar a ausência desses microrganismos (Figura 9). Após as 48h iniciais de incubação, as mesmas foram mantidas por mais 48h de crescimento mantendo o mesmo resultado, corroborando, assim, com os requisitos estipulados pela ANVISA para comercialização de sucos e refrescos in natura, como também para sucos pasteurizados.

A contaminação de alimentos pode ocorrer durante o cultivo de produtos naturais, na colheita, durante a preparação/lavagem, na distribuição e transporte para as lojas, e até na etapa final na cozinha do consumidor (MACHADO-MOREIRA et al., 2019). Assim, a ausência desses microrganismos se deve ao “mel” não possuir naturalmente esses contaminantes no interior do fruto bem como uma extração que, nesse caso, não provocou a contaminação por manipulação humana, ar atmosférico e equipamentos.

Ainda que as análises do “mel de cacau” para coliformes e *Salmonella sp.* estejam dentro dos padrões microbiológicos especificados pela ANVISA, o mesmo apresenta uma elevada carga microbiológica provocando uma rápida fermentação. Sendo assim, para a preservação da qualidade e das características do produto, é necessária uma diminuição do número de células microbiológicas presentes.

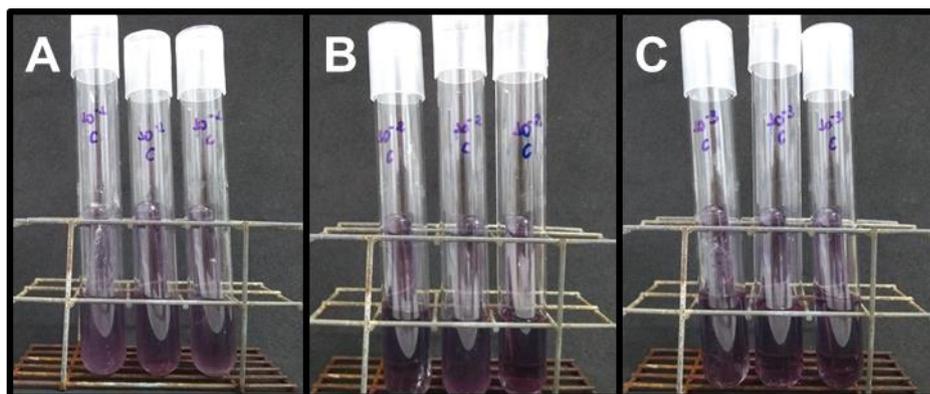


Figura 9. Resultado negativo da amostra não tratada com HHP para o teste presuntivo de coliformes. A – Série de 3 tubos inoculados com 1mL de amostra 1:10. B – Série de 3 tubos inoculados com 1mL de amostra 1:100. C – Série de 3 tubos inoculados com 1mL de amostra 1:1000.

5.1.2 Análises para bactérias mesófilas aeróbias após tratamentos com HHP

Há estudos que apontam eficiente redução na contagem de microrganismos até mesmo de esporos bacterianos quando se aplica uma pressão mais baixa como pré-tratamento, previamente a uma alta pressão, quebrando a dormência dos mesmos, como é possível observar em Mattar et al. (2016). Assim, este trabalho comparou esse tipo de tratamento de baixa pressão seguido de alta pressão com um segundo tratamento que consiste na aplicação de diferentes valores de pressão, um maior que outro, com intervalos em pressão ambiente.

A partir das análises de bactérias mesófilas aeróbias antes e logo após os tratamentos, foi possível observar que o tratamento 1 apresenta um bom resultado quanto a diminuição de bactérias totais presentes no “mel de cacau” (Figura 10). Enquanto que o primeiro apresentou uma redução em 11X da contagem de unidades formadoras de colônia de bactéria em relação à amostra não tratada, o tratamento 2 apresentou uma baixa redução de menos de 2X. Assim, a técnica apresenta indicativos de que seja eficiente para uma completa inativação dos microrganismos do “mel de cacau”. No entanto, para que esse resultado seja alcançado, uma pressão maior do que 300 MPa deve ser aplicada. Como foi observado com o tratamento de

suco de maçã em que pressões de 300 MPa, 400 MPa e 500 MPa foram aplicadas isoladamente por 1 minuto, e a observação de uma menor contagem de bactérias aeróbias foi na pressão mais alta (MCKAY et al., 2011).

O mesmo padrão de resultado foi observado nas amostras que ficaram armazenadas à 4°C. Após 10 dias o número de bactérias totais para o tratamento 1 se igualou ao não tratado, enquanto que o tratamento 2 apresentou uma contagem mais do que 20X o não tratado. Para manter a estabilidade do suco de laranja por 58 dias, foi aplicado uma pressão de 600 MPa por 1 minuto (TIMMERMANS et al., 2011). Bem como para suco de manga, que nessas mesmas condições mesmo não apresentando completa inativação de bactérias aeróbias totais, o suco permaneceu com a contagem estável e segura para consumo (considerado pelos autores o padrão Chinês) por 16 semanas tanto armazenados à 4°C, quanto à 25°C (LIU et al., 2013).

Já as amostras que ficaram 10 dias armazenadas à 25°C não tiveram as análises microbiológicas realizadas, tanto para o tratamento 1 quanto para o tratamento 2. As embalagens apresentaram estufamento e ao alcançar os 10 dias as mesmas já haviam rompido e extravasado todo o líquido que continha dentro, o que seria um sinal de fermentação do produto. Bem como as amostras armazenadas por 10 dias à 25°C e 4°C também não tiveram as análises microbiológicas executadas.

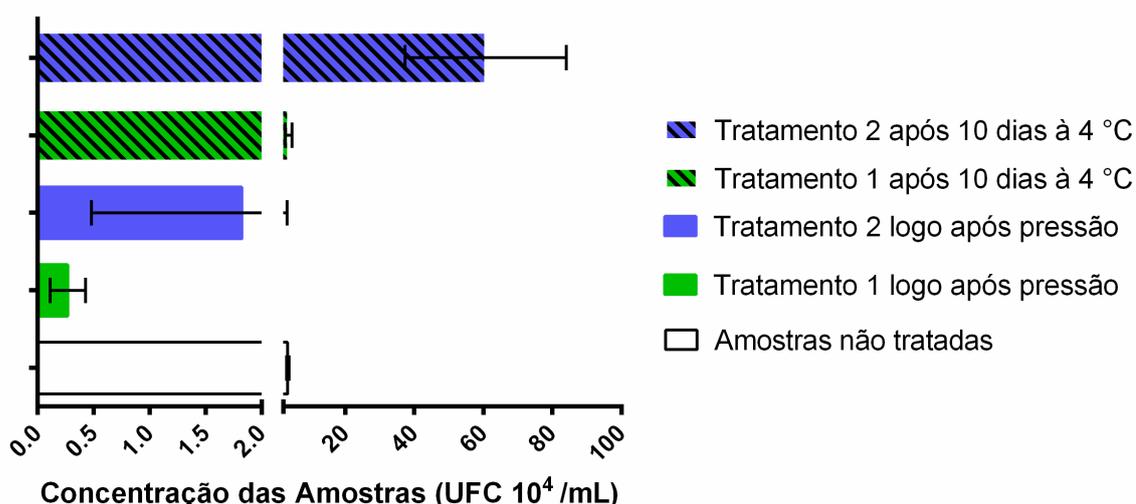


Figura 10. Resultado das contagens de bactérias aeróbias totais em meio PCA dos Tratamento 1 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 50min) e Tratamento 2 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 150 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 225 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 10min) com análises realizadas logo após a pressão e após 10 dias da pressão armazenado à 4°C.

5.1.3 Análises para fungos logo após tratamento com HHP

A Figura 11 mostra um comportamento semelhante ao observado na contagem de bactérias. As contagens realizadas logo após HHP mostraram que o tratamento 1 reduz em aproximadamente 20X o número de UFC/mL. Já o tratamento 2 apresenta apenas uma redução em 2X aproximadamente. Além disso, o mesmo perfil de resultado é observado nas análises de contagem de fungos após 10 dias à 4°C. No entanto, o número de microrganismos aumentou ultrapassando o valor das amostras não tratadas. O tratamento 1 apresentou um aumento de aproximadamente 2X e o tratamento 2 de 16X quando comparado ao não tratado. Estes resultados reforçam os resultados obtidos de bactérias aeróbias totais, em que o tratamento 1 é mais eficiente quando comparado ao tratamento 2, porém para melhorar a estabilidade da amostra referente ao tempo de armazenamento, é necessário um tratamento em que seja aplicado um valor de pressão maior do que o aplicado neste trabalho.

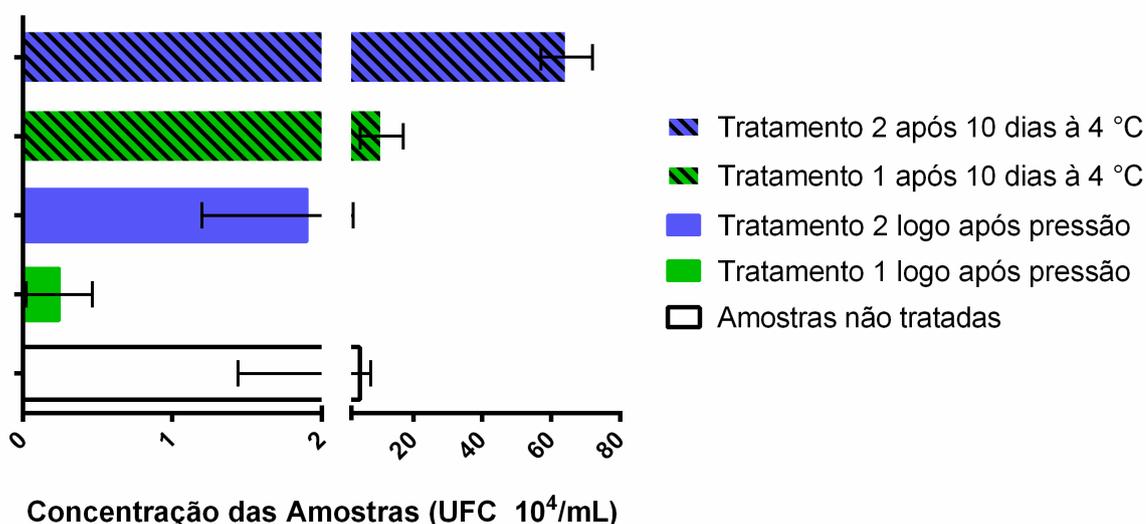


Figura 11. Resultado das contagens de bolores e leveduras em meio BDA dos Tratamento 1 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 50min) e Tratamento 2 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 150 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 225 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 10min) com análises realizadas logo após a pressão e após 10 dias da pressão armazenado à 4°C.

Quando suco de Arônia foi submetido às pressões de 200 MPa, 400 MPa e 600 MPa por 15 minutos, observou-se que a partir de 400 MPa não foi observado crescimento de fungos, nem de bactérias mesófilas aeróbias, sendo esta pressão suficiente para a reduzir a contagem de microrganismos do produto. Além disso, o produto se manteve estável por 80 dias armazenado à 4°C (BŁASZCZAK; AMAROWICZ; GÓRECKI, 2017).

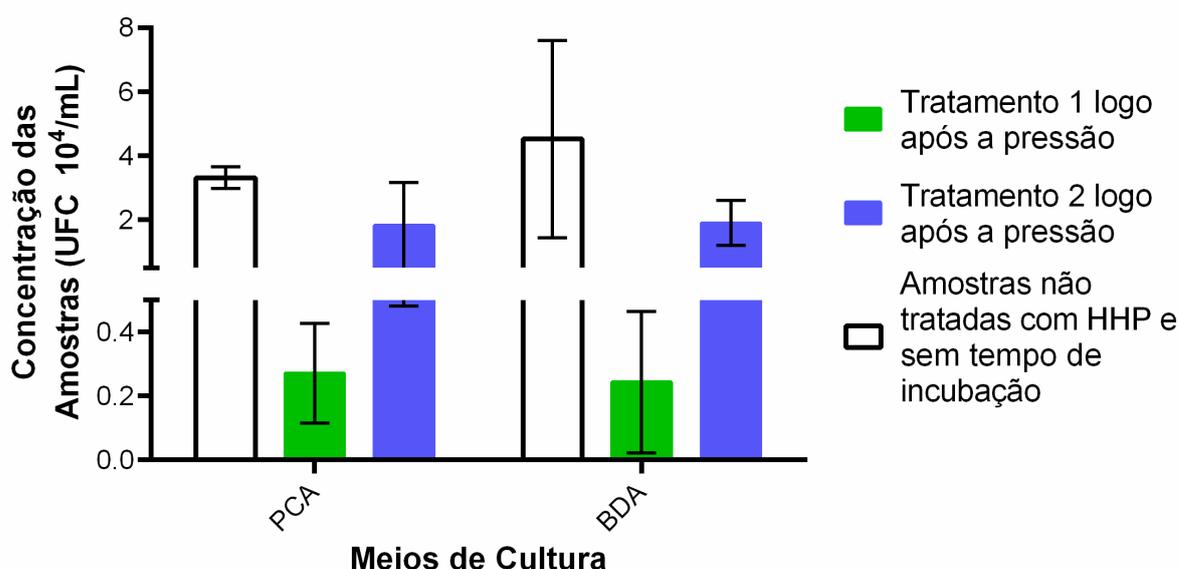


Figura 12. Comparativo dos resultados das contagens de bactérias aeróbias totais em meio de cultura PCA e bolores e leveduras em meio de cultura BDA dos Tratamento 1 (50MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 50min) e Tratamento 2 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 150 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 225 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 10min) com análises realizadas logo após a pressão.

A maior resistência dos microrganismos observada no tratamento 2 pode ter ocorrido devido as pressões iniciais provavelmente terem desencadeado uma resposta ao estresse da pressão levando a uma preparação celular para as pressões mais elevadas. Palhano et al. (2004) mostrou que *Saccharomyces cerevisiae* sobrevive mais quando submetida a um pré-tratamento de estresse sub-letal e incubadas por 15min em pressão ambiente previamente a um estresse severo. Assim, é possível que o aumento gradativo de HHP com intervalos em pressão ambiente possa ter gerado uma resposta positiva quanto à resistência dos microrganismos analisados. Já no tratamento 1, a aplicação de uma alta pressão somente com um pré-tratamento de 3ton (50 MPa) não foi suficiente para promover uma resposta protetiva e ao aplicar

12ton (300 MPa) sem outras pressões intermediárias, a maioria dos microrganismos não resistiram levando a uma queda na contagem.

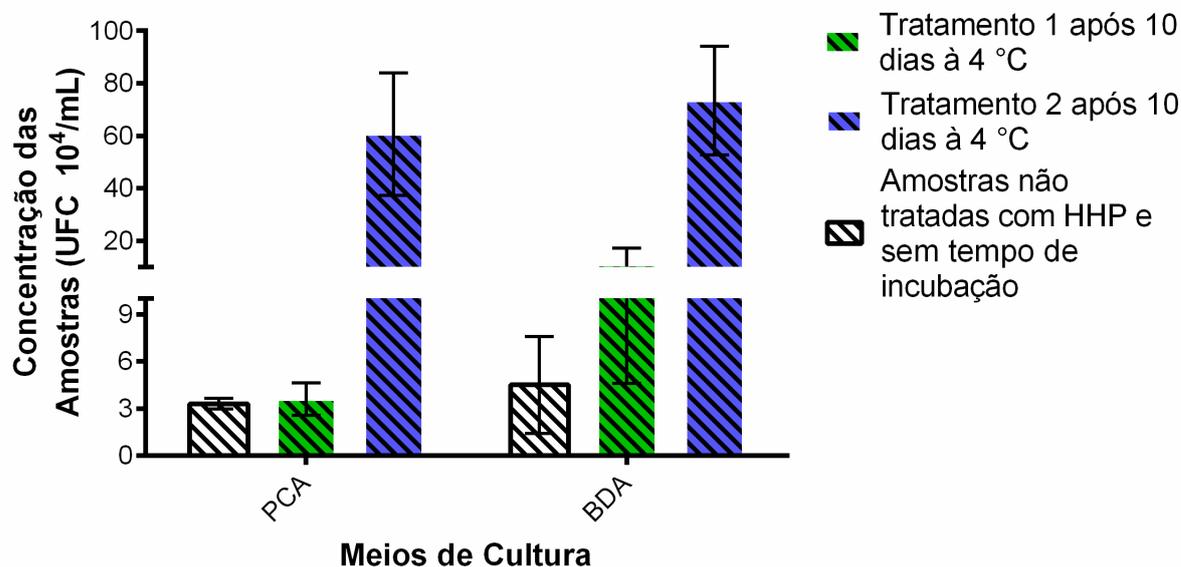


Figura 13. Comparativo dos resultados das contagens de bactérias aeróbias totais em meio de cultura PCA e bolores e leveduras em meio de cultura BDA dos Tratamento 1 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 50min) e Tratamento 2 (50 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 150 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 225 MPa por 10min → 0,1 MPa por 5min → 300 MPa por 10min) com análises realizadas após 10 dias da pressão armazenado à 4°C.

Quando se observa o número de bactérias e de fungos, o último apresentou uma maior quantidade inicialmente. No entanto, nas análises logo após a pressão os números dos dois tipos de microrganismos praticamente se igualam (Figura 12). Adicionalmente, para as análises após 10 dias os fungos se desenvolveram bem mais do que as bactérias (Figura 13). No tratamento 1, os fungos possuíam 3X mais UFC/mL comparado com as bactérias. E, apesar do elevado crescimento para ambos os tipos de organismos considerando os valores do tratamento 1, o tratamento 2 apresentou uma menor diferença entre a quantidade de bactérias e fungos totais, de pouco mais que 1X a mais de fungos. Em geral os fungos têm sido demonstrados mais sensíveis à alta pressão hidrostática do que as bactérias devido as características da parede celular e da morfologia celular desses organismos (LIU et al., 2014; ROOBAB et al., 2018), o que explica um maior número de fungos terem sido afetadas inicialmente. No entanto, os mesmos apresentaram uma maior multiplicação após 10 dias.

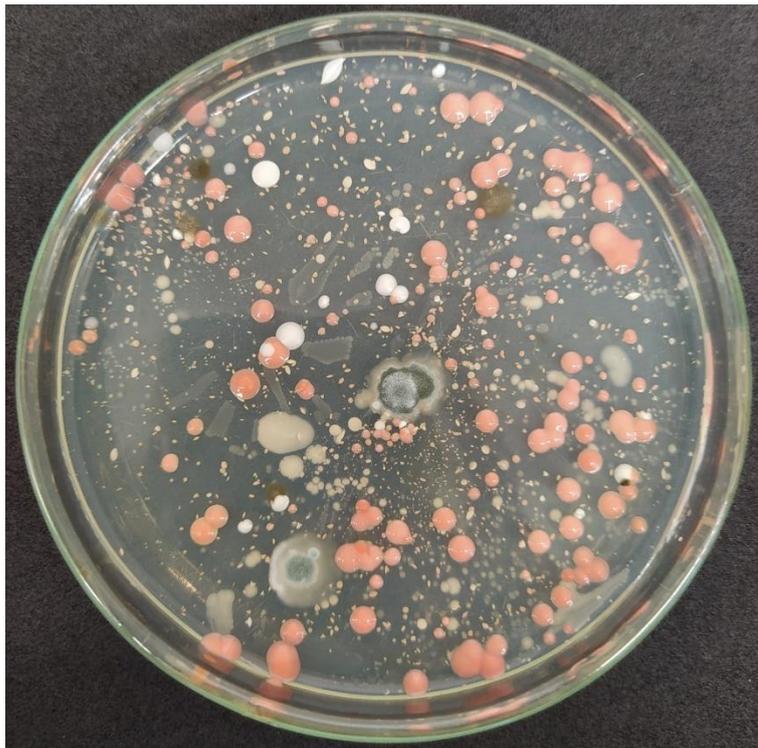


Figura 14. Placa ilustrando bolores e leveduras presentes no “mel de cacau” submetido ao tratamento 1 e analisadas após 10 dias de armazenado à 4°C, na diluição 1:100 em meio BDA.

Além disso, é importante destacar que diferente do que foi observado durante as contagens das placas das amostras não tratadas, em que majoritariamente foi observado crescimento de fungos filamentosos, nas placas das amostras de 10 dias houve um crescimento expressivo de leveduras de colônias rosadas (Figura 14-15), sendo potenciais fermentadoras do “mel de cacau”.

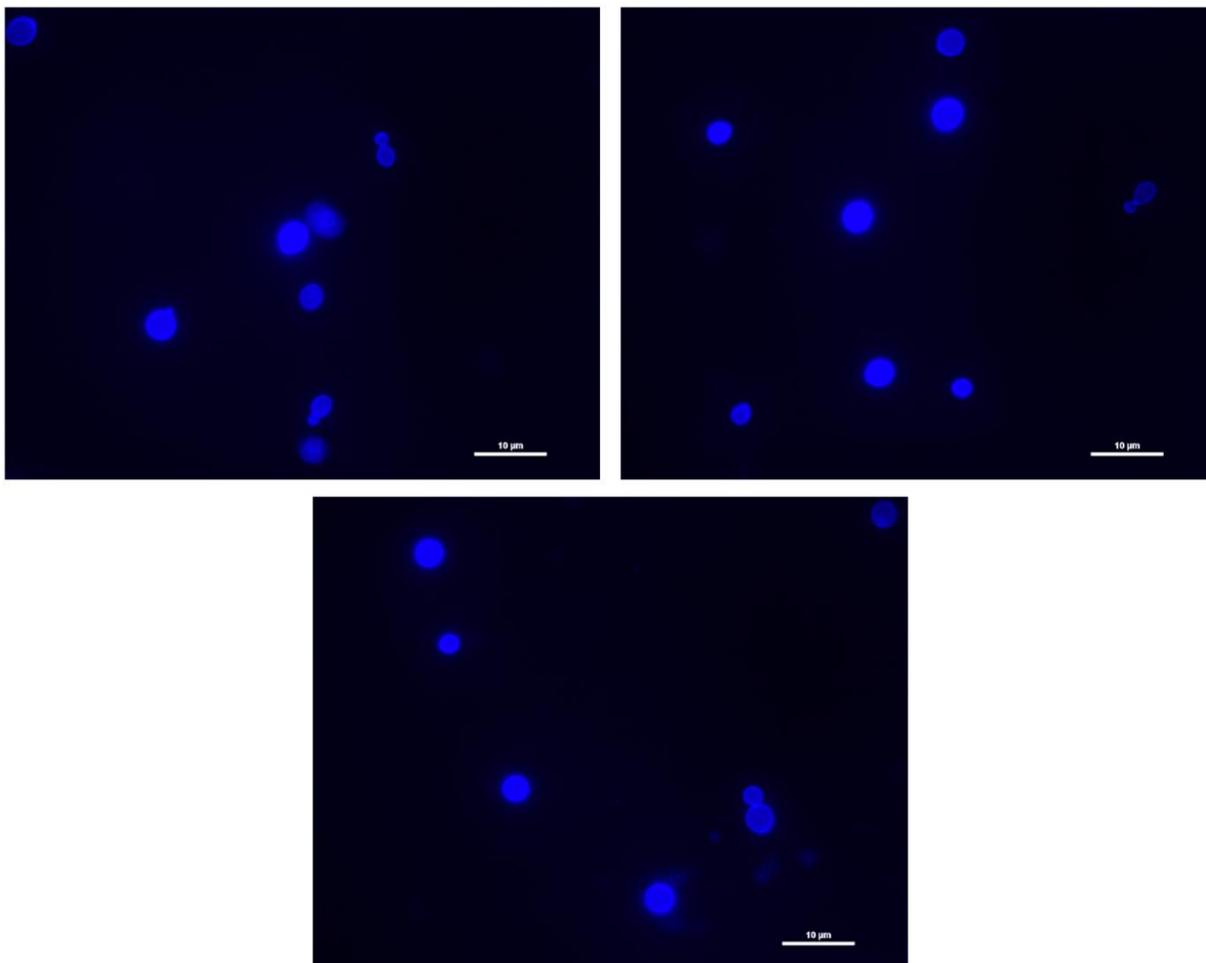


Figura 15. Imagens da levedura de colônia rosada extraída da placa de amostra de “mel de cacau” submetido ao tratamento 1 e analisadas após 10 dias armazenado à 4°C, na diluição 1:100 em meio BDA. As células foram coradas com Calcofluor White Stain (Sigma) e as imagens capturadas usando o microscópio Nikon Eclipse Ti-U na objetiva de 100x.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o “mel de cacau” inicialmente já se enquadrava nos padrões microbiológicos sanitários para alimentos para coliformes e *Salmonella sp.* da Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA. Porém, o mesmo apresentava microrganismos deteriorantes que logo após o tratamento de 50 MPa por 10 minutos, seguido de 5 minutos à pressão ambiente e 300 MPa por 50 minutos ocorreu uma diminuição no número de UFC/mL de tais microrganismos. Assim, a pressão hidrostática possui um potencial de redução da contagem microbiana do “mel” quando realizado esse tratamento. Adicionalmente, as amostras do produto tratado com HHP nos dois tratamentos indicados nesse trabalho apresentaram sinais de elevada multiplicação microbiana quando armazenadas à 25°C por 10 dias. O que não foi observado com tanta intensidade nas amostras armazenadas à 4°C no mesmo período. Deste modo, tratamentos em que não ocorra uma completa esterilização, a refrigeração à 4°C é mais recomendada para a estabilidade microbiológica do produto.

7 PERSPECTIVAS

Uma adaptação nas condições de tratamento por alta pressão hidrostática, aumentando para além de 300 MPa pode apresentar resultados efetivos para a conservação desse produto. Promovendo, assim, um valor agregado ao produto e diminuindo os custos de produção por dispensar a necessidade de adição de conservantes e armazenamento refrigerado. Bem como, um método de extração do líquido da polpa com o mínimo de fontes de contaminação contribuirá expressivamente nos resultados quanto as contagens dos microrganismos. Adicionalmente, análises sensoriais deverão ser realizadas para verificar a aceitação do produto.

REFERÊNCIAS

- AMIT, S. K. et al. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. **Agriculture and Food Security**, v. 6, n. 1, p. 51, 2017.
- ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001**. Brasil, 2001.
- BECKETT, S. T. Traditional Chocolate Making. In: _____. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. p. 1–9.
- BŁASZCZAK, W.; AMAROWICZ, R.; GÓRECKI, A. R. Antioxidant capacity, phenolic composition and microbial stability of aronia juice subjected to high hydrostatic pressure processing. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 39, p. 141–147, 2017.
- BLODGETT, R. **BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions>>. Acesso em: 24 dez. 2019.
- BYRD-BREDBENNER, C. et al. Food safety considerations for innovative nutrition solutions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1347, n. 1, p. 29–44, 2015.
- CEPLAC. **Cacau - História e Evolução**. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm>. Acesso em: 29 dez. 2019.
- DE SOUZA, P. A. et al. Cacao— Theobroma cacao. In: RODRIGUES, S.; SILVA, E. DE O.; BRITO, E. S. DE (Eds.). **Exotic Fruits**. 1. ed. Elsevier, 2018. v. 3p. 69–76.
- FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 30 dez. 2019.
- FDA. **Bacteriological Analytical Manual (BAM) | FDA**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>>. Acesso em: 1 nov. 2019.
- KHAN, I. et al. Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review. **Food Control**, v. 73, p. 1426–1444, 2017.
- LIU, F. et al. Effects of high hydrostatic pressure and high-temperature short-time on mango nectars: Changes in microorganisms, acid invertase, 5-hydroxymethylfurfural, sugars, viscosity, and cloud. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 22–30, 2014.
- MACHADO-MOREIRA, B. et al. Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and How? **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 6, p. 1727–1750, 2019.
- MATTAR, M. D. S. et al. **PROCESSO PARA DESCONTAMINAÇÃO DE ÁGUA DE COCO E ÁGUA DE COCO DESCONTAMINADA**. Brasil, 2016.

MCKAY, A. M. et al. A comparative study of changes in the microbiota of apple juice treated by high hydrostatic pressure (HHP) or high pressure homogenisation (HPH). **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1426–1431, 2011.

MERCADO DO CACAU. “Mel” de cacau, raridade precíval, chega a São Paulo engarrafado - Mercado do Cacau. Disponível em: <<http://mercadodocacau.com/artigo/mel-de-cacau-raridade-precivel-chega-a-sao-paulo-engarrafado>>. Acesso em: 29 dez. 2019.

MINIFIE, B. W. History and Development. In: _____. **Cocoa, chocolate, and confectionery**. 3. ed. Boston, MA: Springer US, 2005. p. 467–479.

MORORÓ, R. C. Aproveitamento dos derivados, subprodutos e resíduos do cacau. In: VALLE, R. R. (Ed.). **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**. 2. ed. Itabuna-BA: CEPLAC, 2012. p. 597–654.

PALHANO, F. L. et al. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 50, n. 4, p. 447–457, 2004.

ROMÁN, S.; SÁNCHEZ-SILES, L. M.; SIEGRIST, M. The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 44–57, 2017.

ROOBAB, U. et al. The Impact of Nonthermal Technologies on the Microbiological Quality of Juices: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 437–457, 2018.

SANTOS, C. O. DOS. **Aproveitamento industrial de “mel” de cacau (*Theobroma cacao* L) na produção de geléia sem adição de açúcar**. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

TIMMERMANS, R. A. H. et al. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 3, p. 235–243, 2011.

VECTORSTOCK. **Cacao fruit raw cacao beans with leaves cocoa pod vector**. Disponível em: <<https://cdn5.vectorstock.com/i/1000x1000/30/79/cacao-fruit-raw-cacao-beans-with-leaves-cocoa-pod-vector-20963079.jpg>>. Acesso em: 12 jan. 2020.

WANG, C.-Y. et al. Recent Advances in Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 527–540, 2016.

ZHANG, Z.-H. et al. Non-thermal technologies and its current and future application in the food industry: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 1, p. 1–13, 2019.

APÊNDICE A – Quadros Com as Médias das Contagens de Bactérias Totais e de Fungos Totais

Quadro 1. Quadro com os valores das médias de contagem de bactérias totais, com desvio padrão, das amostras em meio PCA.

Tratamento	Média da Concentração (UFC/mL)
Amostra não tratada com HHP e sem tempo de incubação	$3,3 \pm 0,3 \times 10^4$
1 logo após a pressão	$0,3 \pm 0,2 \times 10^4$
2 logo após a pressão	$1,8 \pm 1,3 \times 10^4$
1 após dez dias à 4°C	$3,6 \pm 1,0 \times 10^4$
2 após dez dias à 4°C	$60,7 \pm 23,4 \times 10^4$

Quadro 2. Quadro com os valores das médias de contagem de fungos totais, com desvio padrão, das amostras em meio BDA.

Tratamento	Média da Concentração (UFC/mL)
Amostra não tratada com HHP e sem tempo de incubação	$4,5 \pm 3,1 \times 10^4$
1 logo após a pressão	$0,2 \pm 0,2 \times 10^4$
2 logo após a pressão	$1,9 \pm 0,7 \times 10^4$
1 após dez dias à 4°C	$10,9 \pm 6,3 \times 10^4$
2 após dez dias à 4°C	$73,5 \pm 20,7 \times 10^4$

ANEXO A – Tabela do Número Mais Provável

Tabela 1. Para 3 tubos cada um com 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL de inoculação, os NMPs por grama ou mililitro e intervalos de confiança de 95%.

Tubos positivos			NMP/g ou mL	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/g ou mL	Limite de confiança	
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		Mín.	Máx.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		Mín.	Máx.
0	0	0	<>	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

Fonte: Adaptado e com tradução própria de Blodgett (2019).